



Universidad de Valladolid

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR Y FISIOLÓGÍA



PROYECTO FIN DE MÁSTER:

**Estudio de la expresión de IDE (insulin degrading enzyme)
en páncreas de población diabética y control**

Presentado por:

Cristina María Fernández Díaz

Dirigido por:

Dra. Irene Cózar Castellano

ÍNDICE

Abreviaturas	2
Introducción	3
- Diabetes Mellitus e islote pancreático	3
- La enzima degradadora de insulina (IDE)	4
Hipótesis y objetivo	8
Material y métodos	9
- Obtención de las muestras	9
- Marcaje IDE/Insulina en secciones de páncreas humanos	9
- Recogida de imágenes y recuento de células	10
- Análisis estadístico	11
Resultados	12
- Cribado de las muestras	12
o Tinción hematoxilina-eosina	12
o Inmunofluorescencia	13
- Marcaje IDE/Insulina	13
o Recuento de células β -pancreáticas	13
o Expresión de la proteína IDE (Insulin Degrading Enzyme)	15
▪ Presencia de IDE en células β pancreática	15
▪ Presencia de IDE en el islote pancreático	17
Discusión	20
Conclusiones	23
Bibliografía	24

ABREVIATURAS

ADO = Antidiabéticos orales

BSA = Albúmina de suero bovino

DM = Diabetes Mellitus

DM2 = Diabetes Mellitus tipo 2

DM1 = Diabetes Mellitus tipo 1

GSIS = Glucose-stimulated insulin secretion/Secreción de insulina estimulada por glucosa

HA = Hombre Antidiabético

HC = Hombre Control

HI = Hombre Insulinizado

IDE = Insulin degradin enzyme/Enzima degradadora de la insulina

MA = Mujer Antidiabético

MC = Mujer Control

MI = Hombre Insulinizado

NGS = Suero normal de cabra

OMS = Organización mundial de la salud

PBS = Tampón fosfato salino

PDX1 = Homeobox pancreático y duodenal 1

INTRODUCCIÓN

- Diabetes Mellitus e islote pancreático

La diabetes es una enfermedad crónica que aparece cuando el páncreas no produce insulina suficiente o cuando el organismo no utiliza eficazmente la insulina que produce. En el mundo hay más de 347 millones de personas con diabetes y según proyecciones de la OMS, la diabetes será la séptima causa de mortalidad en 2030 [1].

El precoz diagnóstico y tratamiento de esta enfermedad es un pilar fundamental para la prevención de las patologías asociadas a esta (cardiopatía, neuropatía, retinopatía...) y de la mejora en la calidad y esperanza de vida de los pacientes diabéticos, además de un gran ahorro en el gasto sanitario [2]. Los dos tipos de diabetes más comunes son:

- Diabetes tipo 1 es causada generalmente por una reacción autoinmune, donde el sistema de defensa del cuerpo ataca las células que producen la insulina, produciendo así muy poca o ninguna insulina.
- Diabetes tipo 2 se caracteriza por una resistencia periférica a la insulina que desencadena una mayor demanda de ésta para compensarla. Esta compensación finalmente falla debido a una pérdida en la masa funcional de células beta-pancreáticas, debido bien a la pérdida de células (por aumento de su muerte y/o pérdida de la capacidad de regenerarse) y/o al fallo de su capacidad de secretar insulina. Representa al menos el 90% de todos los casos de diabetes.

La insulina es una hormona producida por el páncreas, que actúa como una llave para permitir que la glucosa pase de la sangre a los tejidos del cuerpo para producir energía. El páncreas es un tejido exocrino y endocrino. Las células endocrinas del páncreas se localizan en los islotes de Langerhans (Figura 1). Estos islotes están altamente vascularizados y contienen múltiples tipos de células que producen hormonas con distinta actividad biológica. La célula secretoras de insulina, también llamadas células beta-pancreáticas, son las más abundante dentro del islote (50-80%). Éstas son las encargadas de regular los niveles sanguíneos de glucosa mediante la exocitosis de insulina [3].

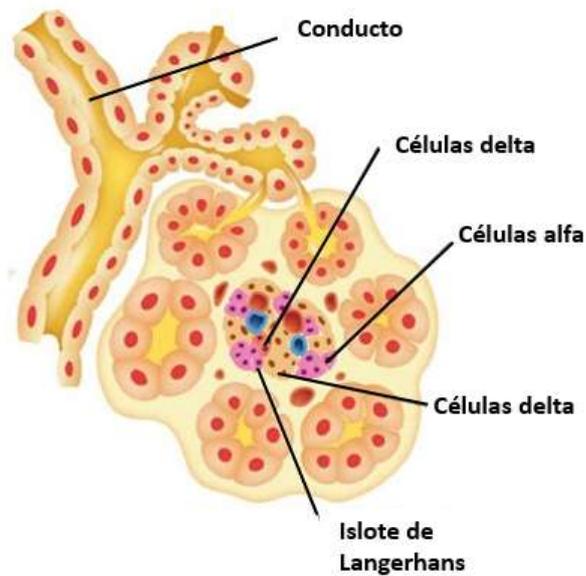


Figura 1. Dibujo de un islote pancreático de Langerhans, donde se muestran los diversos tipos de células productoras de hormonas. (<http://elbibliote.com/resources/Temas/html/638.php>)

No ser capaz de producir insulina o usarla de manera ineficiente conlleva a adquirir unos elevados niveles de glucosa en sangre (hiperglucemia). A largo plazo, esta hiperglucemia sostenida se asocia con daño celular y con insuficiencia de varios órganos y tejidos [3].

Esta hiperglucemia ocasiona un aumento en la demanda de insulina que la célula beta-pancreática trata de compensar, lo que conduce a un fallo progresivo de la misma. Esta disfunción viene derivada de la combinación de varios factores, como son la toxicidad a la glucosa (glucotoxicidad), la lipotoxicidad, el aumento de deposiciones del péptido amiloide en los islotes, y las citoquinas inflamatorias [4,5]. A pesar de ello, parte del mecanismo molecular que subyace al fallo funcional de la célula beta-pancreática todavía no ha sido elucidado. Son necesarios más estudios en esta dirección, para una mejor comprensión del debut de la DM2 y una óptima aproximación farmacológica de la misma.

- La enzima degradadora de la insulina (IDE)

Durante muchos años la degradación de la insulina ha sido vista como un mecanismo pasivo y no se consideraba su implicación en la regulación del metabolismo. Ahora está claro que la eliminación y la degradación de la insulina son procesos regulados, y que las anomalías en los mismos son parte integral de enfermedades como la DM2. Recientemente, se ha sugerido que la interacción de la proteína IDE con la insulina y su degradación pueden desempeñar un papel más directo en la regulación de los efectos de esta hormona.

IDE es una metaloproteasa de zinc de 110 kDa estructuralmente conservada, con localización ubicua en el organismo, que se expresa tanto en tejidos sensibles a insulina como no sensibles. Su localización es mayoritariamente citosólica, con pequeñas porciones en otras fracciones subcelulares como membranas plasmáticas, endosomas y peroxisomas. Posee una actividad proteolítica cuya función principal es la degradación de insulina en sitios específicos (Figura 2). La alta afinidad de IDE por la insulina viene determinada por la estructura tridimensional de este sustrato [6].

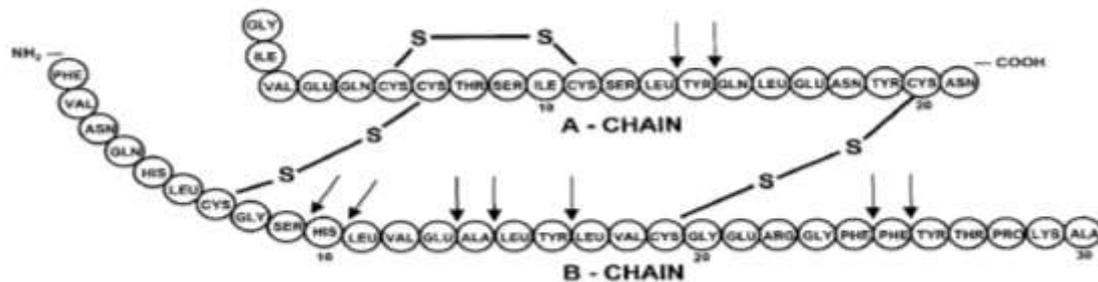


Figura 2. Estructura primaria de la insulina donde se muestran con flechas los sitios de escisión originados por IDE. (WC Duckworth et al.: *Bioquímica* 28:2471-2477, 1989 (103). © American Chemical Society.)

Como se observa de manera esquematizada en la Figura 3, la insulina se une a su receptor de la superficie celular (1) haciendo que este se autofosforile (2) por medio de sus residuos tirosina quinasa, que a su vez fosforila a IRS (insulin receptor substrate) y otras moléculas de la cascada de señalización, incrementando así la captación de glucosa, la síntesis de glucógeno y la mitogénesis (3). Después de la unión de la insulina, el receptor se internaliza en endosomas (4), donde se inicia la degradación. Tras esto, el receptor de insulina se recicla a la superficie celular junto con la insulina degradada y la intacta (5).

La insulina también entra al citosol (6), donde se une a la IDE citosólica. IDE puede encontrarse asociada al proteosoma (7), incrementando la actividad proteolítica del mismo (8). La unión de IDE a la insulina causa la disociación del complejo IDE-proteosoma, haciendo así que se disminuya la actividad de éste (9). Una vez la insulina se une a IDE se produce su degradación (10). Tras este proceso, IDE se vuelve a asociar con el proteosoma (8) [7].

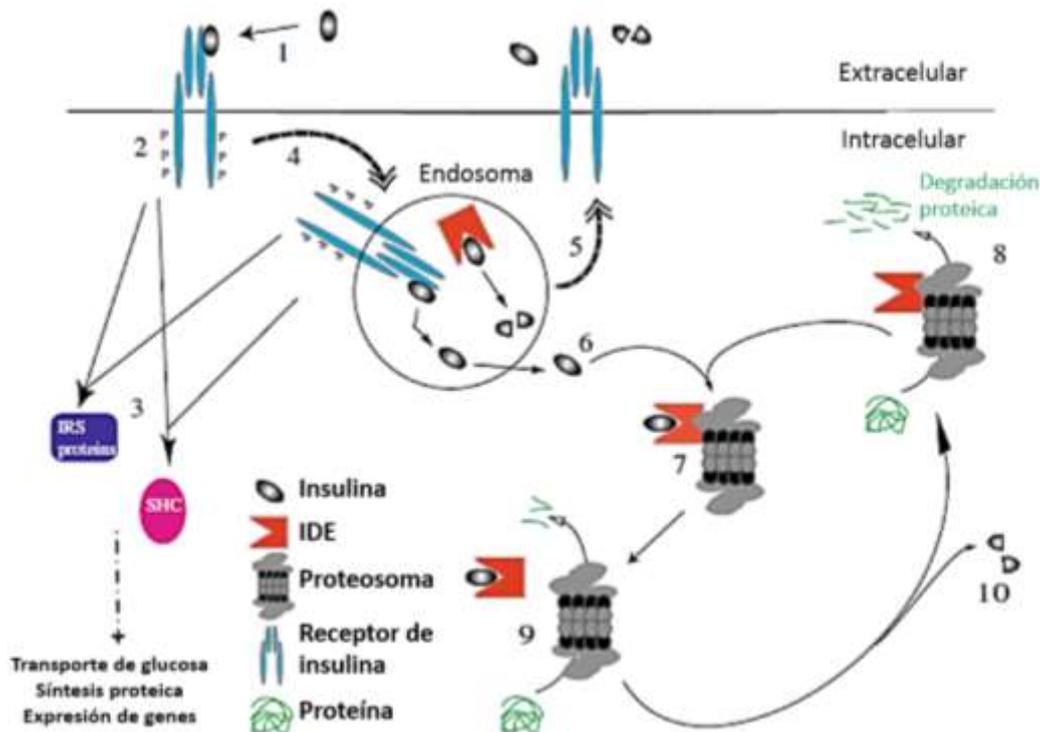


Figura 3. Diagrama esquemático de la degradación de la insulina y su interacción con acción de la insulina. (*Diabetologia*. 2009 Aug;52(8):1457-60. doi: 10.1007/s00125-009-1414-8. Epub 2009 Jun 6. *Hyperglycaemia and hyperinsulinaemia: is insulin-degrading enzyme the missing link?* Fawcett J, Duckworth WC.)

IDE degrada además de insulina otros pequeños péptidos como el glucagón y el péptido beta amiloide (causante de las placas de amiloide de la enfermedad de Alzheimer) [8]. IDE también posee funciones reguladoras del proteosoma, de receptores de esteroides, en la oxidación de los ácidos grasos en los peroxisomas, en el crecimiento y el desarrollo lo que indica el papel multifuncional de esta proteína [9,10].

Son casi inexistentes las publicaciones sobre el papel de IDE en las células beta del páncreas, ya que los estudios de esta proteína en el contexto de la homeóstasis de la glucosa se han centrado en el hígado, que es donde ocurre el mayor aclaramiento de la hormona.

La dificultad de obtención de páncreas humanos post-mortem y la imposibilidad de biopsiar este órgano agrava aún más esta carencia de estudios ex vivo en humanos. Debido a este hecho, hay una gran controversia acerca del papel de IDE en la regulación de la homeóstasis de la glucosa.

La idea de que la inhibición de IDE podría aumentar la vida media de la insulina circulante, beneficiando así la captación de glucosa en el tratamiento de la diabetes es algo que ya fue descrito hace más de 50 años [11]. Trabajos recientes en modelos animales producen la idea contradictoria de que una reducción de la actividad de IDE

puede inducir un fenotipo diabético [12, 13]. Se han descrito polimorfismos en el gen codificante de IDE que incrementan el riesgo de padecer DM2 [13]. Además, la mutación de IDE en ratones ha mostrado alteraciones en el metabolismo de la insulina, como insulino-resistencia, hiperglucemia y otras características típicas de la DM2 [13,14]. Estudios genómicos de la DM2 asocian locus cromosómicos de susceptibilidad con genes que controlan la secreción de insulina [15] como lo es el locus de IDE, el cual ha sido identificado como de susceptibilidad para sufrir diabetes [16, 17].

Ensayos recientes de función de la célula beta-pancreática en el ratón nulo para IDE muestran que la secreción de insulina estimulada por glucosa (GSIS) se encuentra disminuida, debido a un fallo en el recambio de los gránulos de insulina [18]. Por otro lado, se ha visto que la sobreexpresión de IDE en hígado aumenta la degradación de la insulina y disminuye la eficiencia de su vía de señalización [19].

Estos datos, demuestran la importancia del papel de IDE en la fisiología de la célula β -pancreática y en la fisiopatología de la Diabetes Mellitus, lo que genera la necesidad de realizar estudios específicos de la función de IDE en la célula beta-pancreática humana.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

IDE se localiza en las células del islote pancreático humano, teniendo una distribución diferencial entre pacientes diabéticos y población control.

Objetivo

Estudiar la co-localización de IDE e insulina en cortes de páncreas humanos cadavéricos, de población control y de pacientes diabéticos (tratados con ADO o insulinizados).

MATERIAL Y MÉTODOS

- Obtención de las muestras

Las muestras de páncreas humanos fueron obtenidas del Biobanco del Hospital Clínico San Carlos de Madrid, donde el Servicio de Anatomía Patológica recogió cortes de páncreas provenientes de autopsias autorizadas realizadas en dicho centro (protocolo autorizado por el Comité Ético de Investigación Clínica: código interno nº 12/202), pertenecientes a pacientes clasificados en tres grupos: Población control, población diabética en tratamiento con antidiabéticos orales (ADO) y población diabética en tratamiento insulínico, separados también en cuanto a su sexo. Con el fin de detener todos los procesos de degradación y conservar su composición, estructura y estado, las muestras se sometieron a un proceso de fijación, utilizando formaldehído como sustancia fijadora e incluidas en parafina para su posterior corte en secciones de 5 μm de grosor recogidas en porta objetos Ultra-Plus C/72.

Se fijaron unos concretos criterios de inclusión para seleccionar las muestras:

- Pacientes con edades comprendidas entre 40 y 80 años.
- Páncreas control en los que se observen islotes morfológicamente normales, con estructura adecuada y sin tejido deteriorado en la tinción de hematoxilina-eosina.
- Muestras en las que a su observación al microscopio presenten un número mínimo de islotes pancreáticos ($n \geq 5$).

- Marcaje IDE/Insulina en secciones de páncreas humanos

Para estudiar la expresión de IDE en las células beta-pancreáticas de estas preparaciones histológicas, se eliminó la parafina de los portas sumergiéndolos inicialmente en xilol absoluto durante 15 min y a continuación en una batería de alcoholes con concentraciones decrecientes de etanol partiendo del 100%, posteriormente 95%, 80% y finalmente 70% de concentración durante 10 minutos cada uno.

Se realizaron 2 lavados de 5 minutos con PBS 1X (137mM NaCl, 2,7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄) y se procedió al desmascaramiento del antígeno con citrato sódico (10 mM ácido cítrico - pH6) y en un hervidor de vapor a máxima potencia durante 20 min.

Se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBS1X y se bloqueó para evitar uniones inespecíficas del anticuerpo, añadiendo 100 μl /porta de disolución de bloqueo (PBS 1X, 2% NGS, 1% BSA) y se incubó durante 1 hora en cámara húmeda a temperatura ambiente.

Se incubó con el anticuerpo primario en disolución de bloqueo durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Los anticuerpos primarios que se utilizaron se esquematizan en la Tabla 1.

Anticuerpo	Casa Comercial	Dilución	Especie
Insulina	SIGMA	1:2000	Ratón
IDE	Millipore	1:2000	Conejo

Tabla 1. Anticuerpos primarios para inmunofluorescencia

Al día siguiente, se hicieron 3 lavados con PBS1X de 5 minutos y se bloqueó (100µl/porta) durante 10 minutos a temperatura ambiente con solución de bloqueo (PBS 1X, 2% NGS, 1% BSA).

A continuación se eliminó el bloqueo y se incubó durante 30 minutos con los anticuerpos secundarios correspondientes, según la Tabla 2.

Anticuerpo	Casa Comercial	Dilución	Especie
Alexa 594 anti-Conejo	Invitrogen	1:300	CABRA
Alexa 488 anti-Ratón	Invitrogen	1:200	CABRA

Tabla 2. Anticuerpos secundarios para inmunofluorescencia

A continuación se lavó con PBS1X (3 lavados x 5 minutos) y se montó la preparación con 50 µl de medio de montaje con DAPI (marcador nuclear) a una dilución 1:1000, se añadió un cubre y se reservó a 4°C hasta su posterior observación con microscopía.

- Recogida de imágenes y recuento de células

Las imágenes de los islotes pancreáticos fueron recogidas con un microscopio de Fluorescencia NIKON Eclipse 90i asociado con cámara CCD marca NIKON, modelo DS-Ri1, con un objetivo 20X. Las imágenes fueron visualizadas con los filtros: UV-2A (Ex 330-380), B-2A (Ex 450-490) y G-2A (Ex 510-560).

Éstas fueron analizadas con el programa informático *ImageJ*, con el que se procedió a hacer la composición, montaje de imágenes y el recuento celular.

En primer lugar se contó el número de células β-pancreáticas, considerando positivas aquellas cuya tinción citoplásmica de insulina era positiva. Además de éstas, se contaron todas las células totales del islote, basándonos en el número de núcleos DAPI-positivos presentes en la estructura del mismo.

Finalmente, se cuantificaron las células doble-positivas para IDE e insulina.

Además se analizaron las muestras bajo tinción de hematoxilina para observar la morfología y estado de las preparaciones, lo que también sirvió como criterio de exclusión para descartar aquellas que no tuvieran una morfología adecuada de los islotes, así como aquellas preparaciones que no habían sido conservadas de forma correcta y presentaban necrosis.

- Análisis estadístico

La distribución de las variables, al ser una muestra de $n < 30$ en cada caso, se asumió que seguían una distribución normal. Para estudiar las diferencias entre grupos, se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) de muestras múltiples para revelar las diferencias significativas entre los resultados obtenidos, utilizando el programa estadístico *Statgraphics Centurion XVI*.

RESULTADOS

1- Cribado de las muestras

Para seleccionar las muestras de páncreas humanos a estudiar, en primer lugar, se discriminaron aquellos páncreas procedentes de pacientes que no se encontraban entre el rango de edad seleccionado (40-80 años).

1.1- Tinción Hematoxilina-Eosina

Posteriormente se llevó a cabo un segundo cribado de acuerdo a la morfología y estructura de los tejidos, descartando aquellos páncreas control que presentaban anomalías en su observación con la tinción de hematoxilina-eosina (Figura 4).

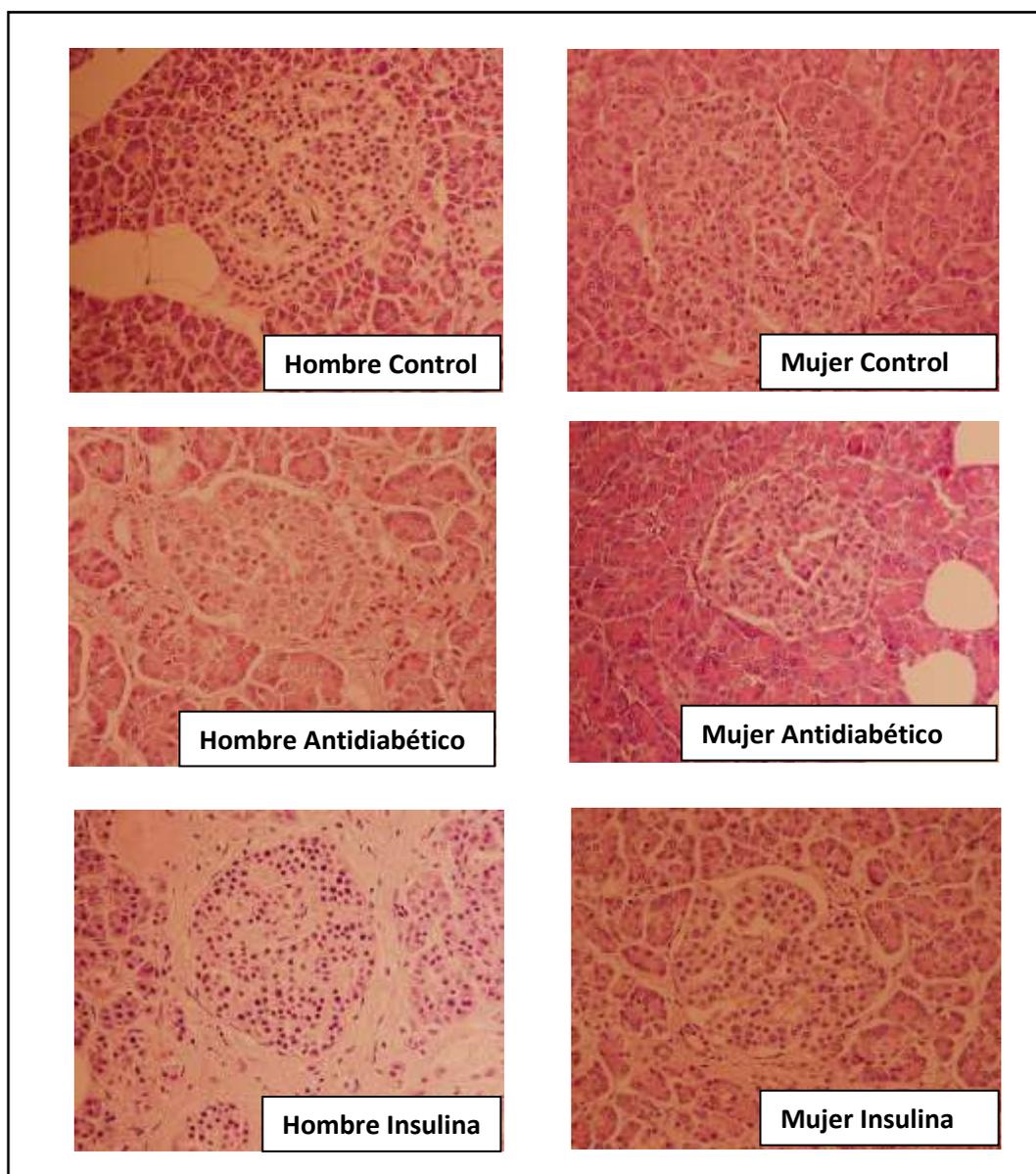


Figura 4. Tinción de hematoxilina-eosina. Fotos tomadas con microscopía óptica de campo claro representativas de cada población de estudio.

1.2- Inmunofluorescencia

Con los criterios anteriores obtuvimos un total de 27 muestras seleccionadas (Tabla 3), a las que se procedió a realizar una inmunofluorescencia para detectar la presencia de la proteína IDE e insulina:

	Hombre Control	Mujer Control	Hombre ADO	Mujer ADO	Hombre Insulina	Mujer Insulina
	HC10	CM27	HA11	MA9	HI2	MI5
	HC30	CM15	HA15	MA13	HI16	MI12
	HC23	CM22	HA16	MA19	HI19	MI9
	HC25	CM21	HA21	MA16	HI15	MI6
		CM28	HA7		HI18	
n=	4	5	5	4	5	4

Tabla 3. Muestras seleccionadas por cada población de estudio.

2- Marcaje IDE/Insulina

Tras determinar las muestras a incluir en el proyecto, se procedió a detectar en ellas la expresión de la proteína IDE y de insulina mediante inmunofluorescencia utilizando anticuerpos específicos para éstas (Tablas 1 y 2). Las muestras marcadas se observaron al microscopio de fluorescencia, donde se tomaron fotos de un número representativo de islotes por cada muestra (8-10 islotes). Tras esto, se analizaron las fotos individualmente para obtener los siguientes resultados.

2.1- Recuento de células β -pancreáticas

Se realizó un recuento del número total de células β de cada islote pancreático, lo cual nos permitió comparar el número de células productoras de insulina entre los diferentes grupos de estudio. Este recuento se llevó a cabo a partir de la inmunofluorescencia realizada para insulina y DAPI (Figura 5).

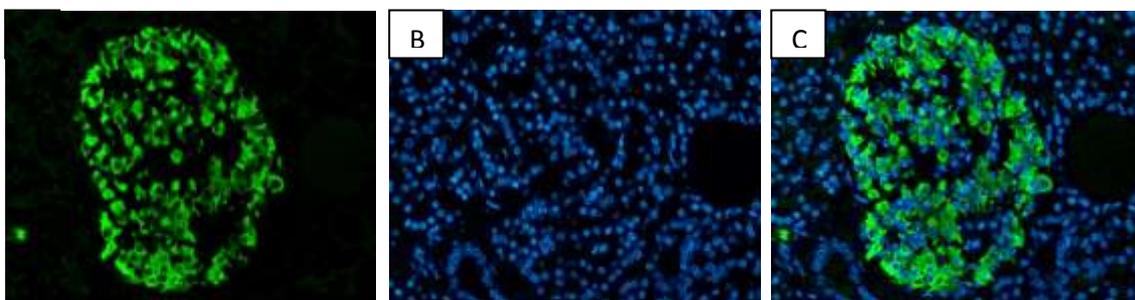


Figura 5. Imágenes representativas de los islotes marcados al microscopio de fluorescencia. A- Marcaje de insulina. B- Marcaje de los núcleos celulares (DAPI). C- Mezcla de A y B

Los islotes de los pacientes control mostraban mayor número de células β , siendo los islotes más compactos, redondeados y uniformes que en los pacientes diabéticos, los cuales presentaban una morfología en sus islotes más desestructurada y una expresión de insulina difusa y de menor intensidad (Figura 6).

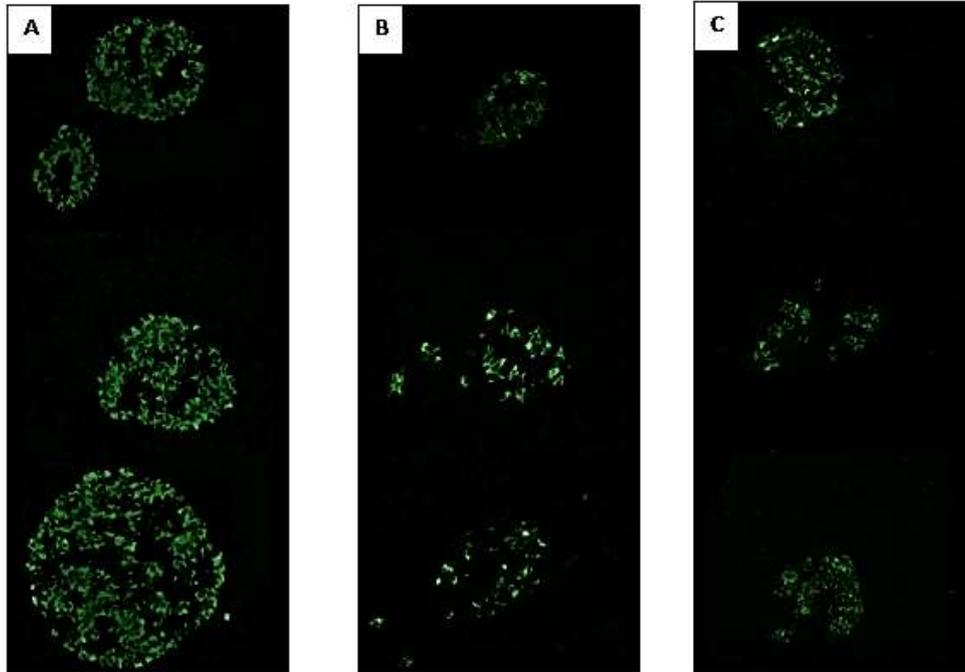


Figura 6. Imágenes representativas de islotes pancreáticos al microscopio de fluorescencia con marcaje de insulina. A- Islotes procedentes de muestras de pacientes control (no diabéticos). B- Islotes de muestras procedentes de muestras de pacientes diabéticos con tratamiento insulínico. C- Islotes de muestras procedentes de muestras de pacientes diabéticos tratados con ADO.

El número de células β -pancreáticas por islote en hombres (Figura 7), fue significativamente mayor en las muestras procedentes de paciente control (no diabéticos), que las de pacientes diabéticos, tanto los tratados con antidiabéticos orales (33.55% menor) como con terapia insulínica (34.56% menor).

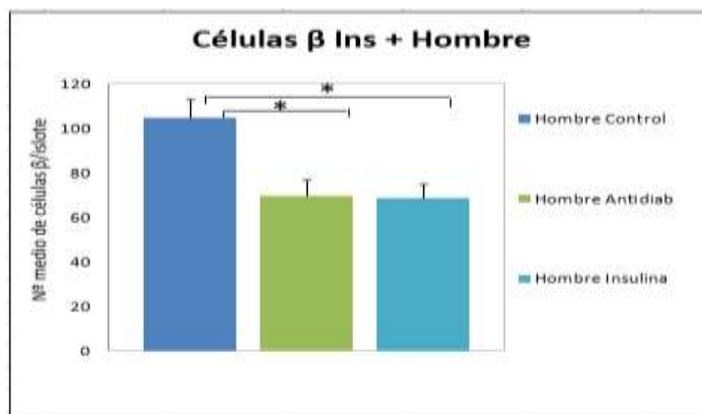


Figura 7. Número medio de células β por cada islote en páncreas procedentes de hombres control, hombres diabéticos en tratamiento con antidiabéticos orales y hombres diabéticos con terapia insulínica. * $p < 0,05$ (respecto al control)

Igualmente, el número de células β -pancreáticas por islote en mujeres (Figura 8), fue significativamente mayor en las muestras procedentes de paciente control (no diabéticos), que las de pacientes diabéticos, tanto los tratados con antidiabéticos orales (34.86% menor) como con terapia insulínica (49.07% menor).

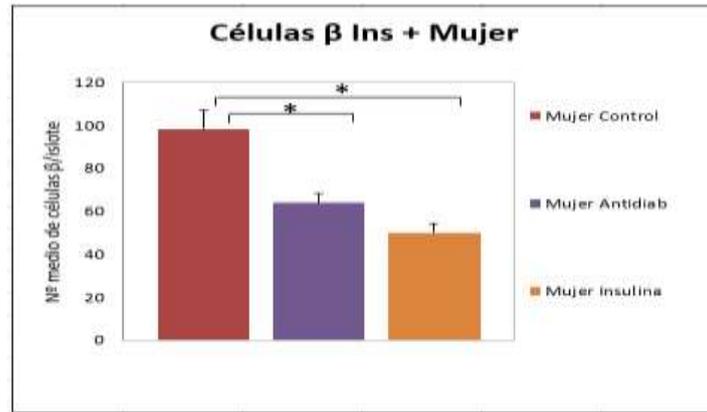


Figura 8. Número medio de células β por cada islote en páncreas procedentes de mujeres control, mujeres diabéticas en tratamiento con antidiabéticos orales y mujeres diabéticas con terapia insulínica. * $p < 0,05$ (respecto al control)

2.1- Expresión de la proteína IDE (Insulin Degrading Enzyme)

Se evaluó la expresión de la proteína IDE, atendiendo a tres aspectos: Evaluación de su expresión por grupos de población, ubicación en el islote pancreático, y localización dentro de las células.

- Presencia de IDE en células β pancreática

Datos preliminares de nuestro laboratorio muestran que IDE se expresa en islotes pancreáticos de ratones control y diabéticos (modelo db/db) estando aumentada en los islotes de los ratones db/db en su fase hiperinsulinémica [35]. Sin embargo, la expresión de esta proteína en páncreas humanos no ha sido estudiada con anterioridad.

La cuantificación de IDE en células productoras de insulina fue inapreciable en población masculina (tanto en muestras control como diabéticos). En cuanto a la población femenina, pudimos cuantificar un bajo porcentaje en diabéticas, cuya expresión de IDE era citoplásmica.

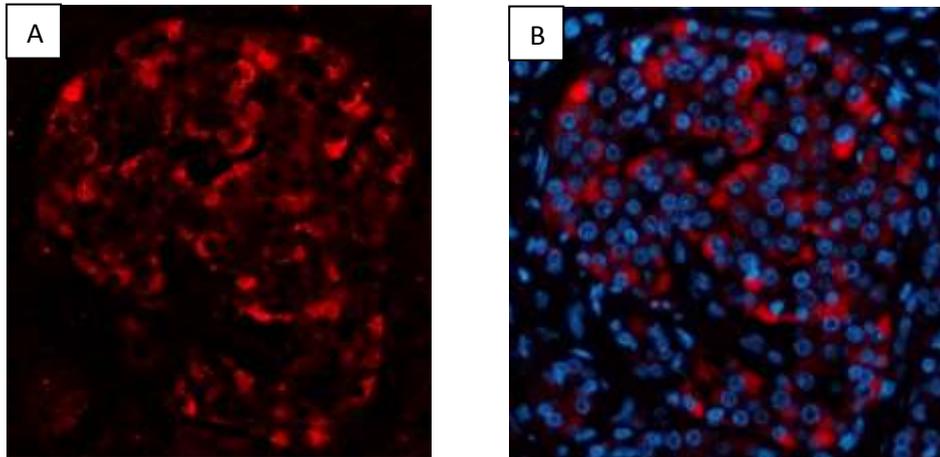


Figura 9. Imágenes representativas de la localización celular de IDE en el islote pancreático. A- Expresión de IDE. B- Expresión de IDE + DAPI.

Se observa un incremento estadísticamente significativo de la expresión de esta proteína en las mujeres diabéticas con tratamiento insulínico en comparación con las mujeres control, en las cuales se observaron valores mínimos no detectables. Este incremento en las mujeres tratadas con insulina, a pesar de no ser estadísticamente significativo, también es notable (56% mayor) respecto al grupo de mujeres diabéticas en tratamiento con antidiabéticos orales.

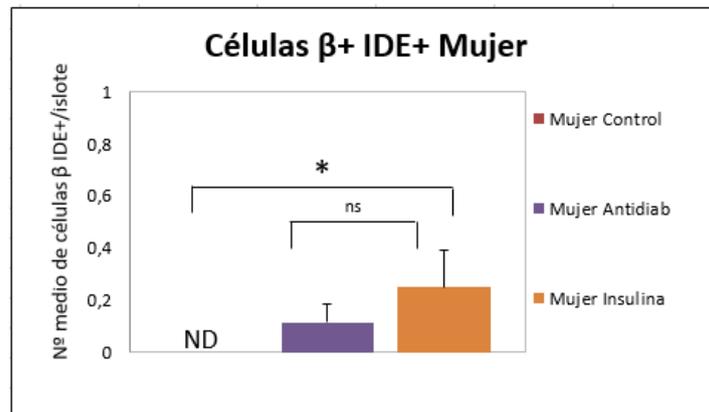


Figura 10. Expresión de la proteína IDE (nº medio de células IDE positivas en células β pancreáticas por cada islote) en células β pancreáticas procedentes de muestras de páncreas femeninos. * $p < 0,05$. ns: no significativo.

- Presencia de IDE en el islote pancreático

Se midió la expresión de IDE en la totalidad de cada islote pancreático individualmente, incluyendo tanto su expresión en células β como en células no β . Como se mencionó anteriormente, la localización de esta proteína fue mayoritariamente citoplásmica en todos los casos.

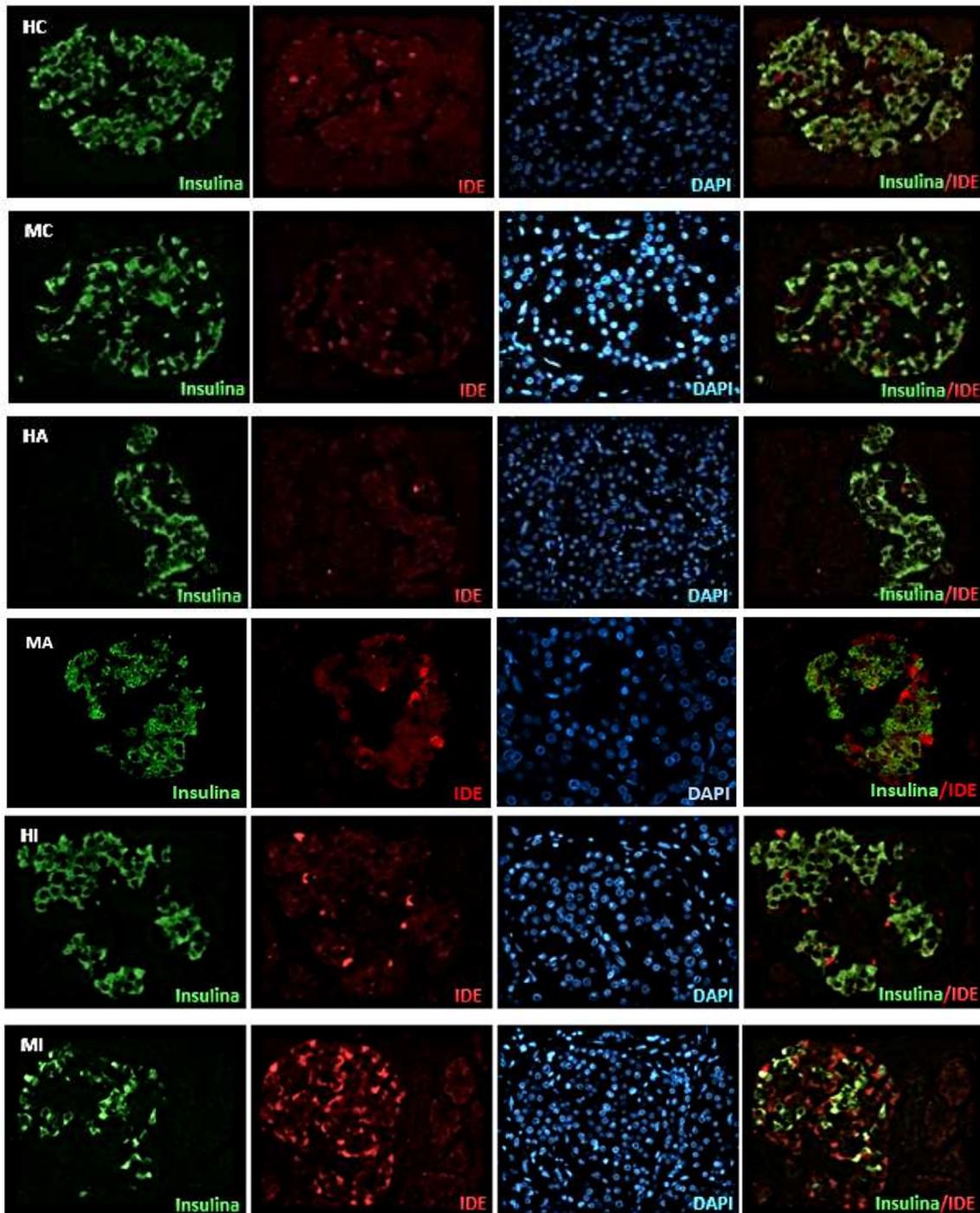


Figura 11. Imágenes representativas de los islotes de cada grupo de estudio al microscopio de fluorescencia: HC (Hombre Control), MC (Mujer Control), HA (Hombre ADO), MA (Mujer ADO), HI (Hombre Insulinizado), MI (Hombre Insulinizado). Marcaje con insulina (1^a columna), marcaje con IDE (2^a columna), marcaje con DAPI (3^a columna), mezcla marcajes de insulina más IDE (4^a columna).

Analizando por un lado los resultados obtenidos de las muestras pancreáticas de hombre, vemos como la presencia de la proteína IDE en hombres diabéticos con tratamiento insulínico es significativamente mayor (90.59% mayor) que en pacientes con farmacoterapia antidiabética. También se observa una mayor expresión comparada con los pacientes control (39.41% mayor), pero esta diferencia no es significativa.

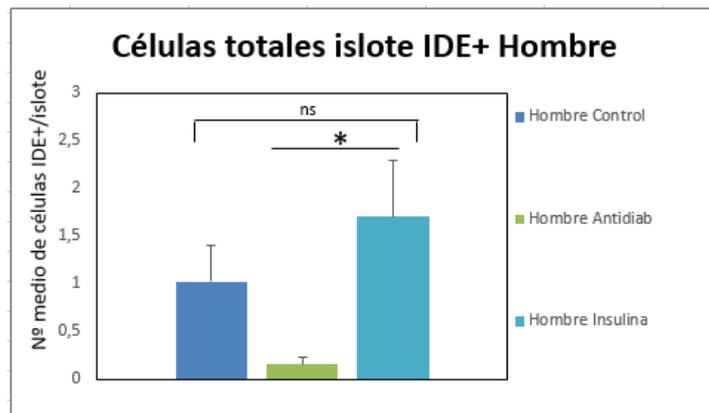


Figura 12. Expresión de la proteína IDE (nº medio de células IDE positivas por cada islote pancreático) procedentes de muestras de páncreas masculinos. * $p < 0,05$. ns: no significativo.

En muestras de páncreas de mujeres, la expresión de IDE, al igual que en el caso de los hombres, se vio incrementada en las muestras procedentes de mujeres diabéticas en tratamiento con insulina. Esta diferencia fue significativa comparada tanto con las mujeres control (43.49% mayor) como con las mujeres diabéticas tratadas con antidiabéticos orales (67.33% mayor), siendo estas últimas las que mostraron niveles de expresión más bajos tanto en hombres como en mujeres.

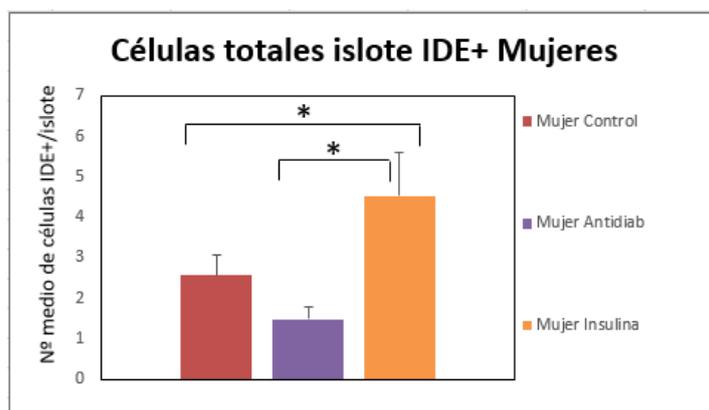


Figura 13. Expresión de la proteína IDE (nº medio de células IDE positivas por cada islote pancreático) procedentes de muestras de páncreas femeninos. * $p < 0,05$ (respecto al control).

La expresión global de IDE en islotes procedentes de páncreas femeninos fue cuantitativamente mayor que la observada en hombres: las mujeres control presentaron un aumento significativo de la expresión (59.77% mayor) respecto a los hombres control; las mujeres diabéticas con tratamiento farmacológico evidenciaron un aumento del 89,19% de la expresión respecto a los hombres de su condición, aunque este aumento no resultó estadísticamente significativo; y finalmente las mujeres diabéticas tratadas con insulina mostraron un incremento significativo en la expresión de IDE (62.48% mayor) respecto a los hombres diabéticos con este tratamiento.

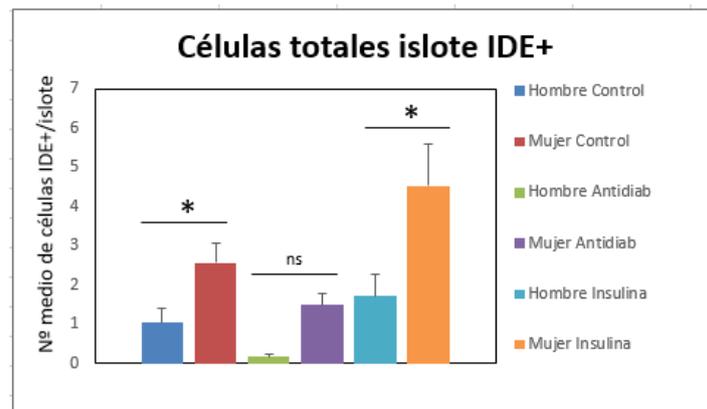


Figura 14. Expresión de la proteína IDE (nº medio de células IDE positivas por cada islote pancreático) procedentes de muestras de páncreas femeninos y masculinos. * $p < 0,05$. ns: no significativo.

DISCUSIÓN

La DM1 se caracteriza por una destrucción autoinmune de las células β -pancreáticas, en cambio, la patogénesis de la DM2 se caracteriza por la resistencia periférica a la captación de glucosa mediada por la insulina, lo que resulta en un aumento de la demanda de insulina para controlar la glucosa circulante. El estrés de satisfacer esta demanda de insulina sobrepasa los mecanismos compensatorios del organismo, lo que conlleva a la pérdida gradual del correcto funcionamiento de las células beta y a una hiperglucemia crónica [20, 21, 22].

Nuestros resultados confirman lo ya publicado en la bibliografía, donde se muestra una disminución del número de células β -pancreáticas en muestras procedentes de autopsias de pacientes con DM2, predominando en estos el volumen de células α respecto a las células β [23-26].

Varios estudios han señalado cambios morfológicos característicos en islotes de pacientes DM2 como los que observamos en nuestras muestras. Estos cambios incluyen fibrosis de los islotes, la distribución anormal de células β dentro de los islotes, y el reducido tamaño y número de islotes [23, 27, 31].

La causa de esta pérdida de masa de células β ha sido estudiada recientemente, sugiriendo que es debida a un incremento de la apoptosis en células β de pacientes con DM2 [29]. Otra posibilidad de esta pérdida de función es la desdiferenciación fenotípica de células β -pancreáticas. Esta pérdida de diferenciación vendría causada por cambios en la expresión génica, como cambios en el metabolismo de la glucosa y desregulación de factores de transcripción y relacionados con el estrés celular. Esta pérdida de diferenciación permitiría a las células volver a un estado de inmadurez, pudiendo adoptar después una diferenciación a células α o permanecer estado inmaduro [30].

Una posible continuidad de nuestro estudio podría basarse en esclarecer si la pérdida de expresión de insulina de las células β que observamos en nuestras muestras, se debe a un proceso de desdiferenciación mediado por IDE, explorando los componentes que están implicados en la diferenciación y mantenimiento de estas células. Uno de estos componentes que despierta gran interés es PDX1, un factor de transcripción específico de las células β , que juega un papel fundamental en la diferenciación del linaje endocrino, mantenimiento y función de las células productoras de insulina, acerca del cual varios autores sugieren un enfoque hacia la reprogramación celular para la generación de nuevas células β [31].

La degradación de la insulina es un proceso regulado que juega un importante papel en la eliminación e inactivación de esta hormona. Se han observado anomalías en este proceso degradativo en varias situaciones patológicas como la DM2 [32].

IDE (insulin-degrading enzyme) posee una actividad proteolítica como “insulinasa”, degrada la insulina con un alto grado de especificidad. Esta proteína se localiza en todos los tipos celulares, tanto los sensibles a insulina como los que no lo son. Su mayor actividad se localiza en el citosol, con pequeñas pero significativas cantidades presentes en otras fracciones subcelulares [33], como membranas plasmáticas, endosomas y peroxisomas, lo cual concuerda con la localización de IDE que encontramos en nuestras muestras al realizar la inmunofluorescencia para IDE, ya que la vemos mayoritariamente en el compartimento citoplásmico.

Diversos estudios muestran que la exposición a insulina aumenta la actividad de la proteína IDE, aumentando el número de sustratos susceptibles a degradarse por la enzima, por lo que ésta aumenta su número [5,34]. Este hallazgo ha sido confirmado por tres sistemas de estudios diferentes en nuestro laboratorio [35]: 1) En el ratón db/db (modelo de resistencia insulínica, obesidad y DM2), en fase hiperinsulinémica, se observó un aumento de la expresión de IDE en el islote; 2) En línea celular INS1E, se observó un aumento de la expresión de IDE bajo un estímulo de insulina; 3) De la misma forma, en cultivos primarios de islotes pancreáticos de rata, observamos un incremento en la expresión de IDE bajo un estímulo de insulina [35]. Estos hechos concuerdan con los resultados observados en nuestro estudio en páncreas humanos, donde observamos que la mayor expresión de IDE en todos los casos se obtiene en pacientes diabéticos cuyo tratamiento se basa en la administración de insulina.

Un reciente estudio en el que se realizó un ratón KO-IDE, mostró que IDE controlaba la función de las células β , ya que estos ratones, que carecían de un gen funcional IDE, eran hiperglucémicos, intolerantes a la glucosa, y tenían una secreción deficiente de insulina debido a la reducción en la reposición de los gránulos de insulina, lo que conllevó un deterioro en la secreción de insulina estimulada por glucosa [18].

Son inexistentes los estudios acerca de la expresión de IDE en islote pancreático humano, debido a que el páncreas es un órgano que no permite biopsia y sólo se pueden hacer estudios sobre páncreas conservados procedentes de autopsias autorizadas. La mayoría de los estudios de la proteína de IDE respecto a su presencia en el organismo se han realizado en hígado [29], adipocitos [36], células musculares [37], eritrocitos [38], mama y riñón [29]. Todo esto nos hace pioneros en el estudio de esta proteína en islotes pancreáticos humanos.

Nuestro estudio muestra una expresión de IDE en células β -pancreática solamente en mujeres, siendo imperceptible en población masculina. Además, es llamativo que la expresión global de la proteína IDE se localice mayoritariamente en células no β .

Además, esta expresión global de IDE es cuantitativamente mayor en páncreas femeninos que en los masculinos. Este sorprendente e inesperado resultado debe ser estudiado más a fondo para elucidar las causas que lo promueven. A su vez, estarían en concordancia con lo publicado por Peitis et al. [39], que mostraron que el estradiol y la progesterona incrementaban la unión y degradación de la insulina, y que la testosterona hacía que disminuyera su degradación.

El compendio de novedosos resultados obtenidos en este estudio necesita que profundicemos en el mismo, aumentando el tamaño muestral y realizando pruebas complementarias para esclarecer el papel de IDE y los mecanismos que lo implican en la homeóstasis de la glucosa. La modificación de la expresión de IDE podría originar una valiosa estrategia terapéutica para la prevención y/o reparación de la función de las células beta-pancreáticas en pacientes con DM2.

CONCLUSIONES

1. Los islotes procedentes de páncreas de pacientes con DM2 revelan cambios en su estructura respecto a los pacientes control: islotes pancreáticos de tamaño más reducido y con un menor número de células β -pancreáticas.
2. La mayor parte de la expresión de IDE dentro del islote pancreático se encuentra en células no β .
3. Los páncreas procedentes de pacientes diabéticos en tratamiento con insulina muestran mayor expresión de IDE respecto a la población control y a los diabéticos tratados con ADO.
4. La expresión de IDE es cuantitativamente mayor en los islotes pancreáticos (tanto en células β -pancreáticas como en células no β) femeninos que en los masculinos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Rathmann, W. and G. Giani, *Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030*. *Diabetes Care*, 2004. 27(10): p. 2568-9; author reply 2569.
2. *IDF Diabetes Atlas Sixth Edition*. International Diabetes Federation 2013
3. Eberhard, D. and E. Lammert, *The pancreatic beta-cell in the islet and organ community*. *Curr Opin Genet Dev*, 2009. 19(5): p. 469-75.
4. Donath, M.Y. and P.A. Halban, *Decreased beta-cell mass in diabetes: significance, mechanisms and therapeutic implications*. *Diabetologia*, 2004. 47(3): p. 581-9.
5. Weir, G.C., et al., *Beta-cell adaptation and decompensation during the progression of diabetes*. *Diabetes*, 2001. 50 Suppl 1: p. S154-9.
6. Muller D, Schulze C, Baumeister H, Buck F, Richter D 1992 *Rat insulin-degrading enzyme: cleavage pattern of the natriuretic peptide hormones ANP, BNP and CNP revealed by HPLC and mass spectrometry*. *Biochemistry* 31:11138–11143
7. Fawcett, J. and W.C. Duckworth, *Hyperglycaemia and hyperinsulinaemia: is insulin-degrading enzyme the missing link?* *Diabetologia*, 2009. 52(8): p. 1457-60.
8. Farris, W., et al., *Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid beta-protein, and the beta-amyloid precursor protein intracellular domain in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100(7): p. 4162-7.
9. Fawcett, J., et al., *Regulation of protein degradation by insulin-degrading enzyme: analysis by small interfering RNA-mediated gene silencing*. *Arch Biochem Biophys*, 2007. 468(1): p. 128-33.
10. Hamel, F.G., et al., *Insulin inhibits peroxisomal fatty acid oxidation in isolated rat hepatocytes*. *Endocrinology*, 2001. 142(6): p. 2702-6.,
11. Mirsky, I.A. and R.H. Broh-Kahn, *The inactivation of insulin by tissue extracts; the distribution and properties of insulin inactivating extracts*. *Arch Biochem*, 1949. 20(1): p. 1-9.
12. Fakhrai-Rad, H., Nikoshkov, A., Kamel, A., Fernström, M., Zierath, J. R., Norgren, S. & Galli, J. (2000). *Insulin-degrading enzyme identified as a candidate diabetes susceptibility gene in GK rats*. *Human molecular genetics*,9(14), 2149-2158.
13. Karamohamed, S., Demissie, S., Volcjak, J., Liu, C., Heard-Costa, N., Liu, J. & Herbert, A. (2003). *Polymorphisms in the insulin-degrading enzyme gene are*

- associated with type 2 diabetes in men from the NHLBI Framingham Heart Study. Diabetes, 52(6), 1562-1567.*)
14. Farris, W., Mansourian, S., Leissring, M. A., Eckman, E. A., Bertram, L., Eckman, C. B. & Selkoe, D. J. (2004). *Partial loss-of-function mutations in insulin-degrading enzyme that induce diabetes also impair degradation of amyloid β -protein*. The American journal of pathology, 164(4), 1425-1434.)
 15. Tabara, Y., et al., *Replication study of candidate genes associated with type 2 diabetes based on genome-wide screening*. Diabetes, 2009. **58**(2): p. 493-8.
 16. Rudovich, N., et al., *Polymorphisms within insulin-degrading enzyme (IDE) gene determine insulin metabolism and risk of type 2 diabetes*. J Mol Med (Berl), 2009. **87**(11): p. 1145-51.
 17. Cotsapas, C., et al., *Expression analysis of loci associated with type 2 diabetes in human tissues*. Diabetologia, 2010. **53**(11): p. 2334-9.
 18. Steneberg, P., et al., *The type 2 diabetes-associated gene ide is required for insulin secretion and suppression of alpha-synuclein levels in beta-cells*. Diabetes, 2013. 62(6): p. 2004-14.
 19. Seta, K.A. and R.A. Roth, *Overexpression of insulin degrading enzyme: cellular localization and effects on insulin signaling*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. 231(1): p. 167-71.
 20. Kilimnik, G., Zhao, B., Jo, J., Perival, V., Witkowski, P., Misawa, R., & Hara, M. (2011). *Altered islet composition and disproportionate loss of large islets in patients with type 2 diabetes*. PloS one, 6(11), e27445.
 21. Marchetti, P., Del Prato, S., Lupi, R., & Del Guerra, S. (2006). *The pancreatic beta-cell in human Type 2 diabetes*. Nutrition, metabolism and cardiovascular diseases, 16, S3-S6.
 22. Marchetti, P., Dotta, F., Lauro, D., & Purrello, F. (2008). *An overview of pancreatic beta-cell defects in human type 2 diabetes: implications for treatment*. Regulatory peptides, 146(1), 4-11.
 23. Yoon, K. H., Ko, S. H., Cho, J. H., Lee, J. M., Ahn, Y. B., Song, K. H. & Bonner-Weir, S. (2003). *Selective β -cell loss and α -cell expansion in patients with type 2 diabetes mellitus in Korea*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 88(5), 2300-2308.
 24. Klöppel, G., Löhr, M., Habich, K., Oberholzer, M., & Heitz, P. (1985). *Islet pathology and the pathogenesis of type 1 and type 2 diabetes mellitus revisited*. Pathology and Immunopathology Research, 4(2), 110-125.

25. Clark, A., Wells, C. A., Buley, I. D., Cruickshank, J. K., Vanhegan, R. I., Matthews, D. R. & Turner, R. C. (1988). *Islet amyloid, increased A-cells, reduced B-cells and exocrine fibrosis: quantitative changes in the pancreas in type 2 diabetes*. Diabetes research (Edinburgh, Scotland), 9(4), 151-159.
26. Stefan, Y., Orci, L., Malaisse-Lagae, F., Perrelet, A., Patel, Y., & Unger, R. H. (1982). *Quantitation of endocrine cell content in the pancreas of nondiabetic and diabetic humans*. Diabetes, 31(8), 694-700.
27. Saito, K., Takahashi, T., Yaginuma, N., & Iwama, N. (1978). *Islet morphometry in the diabetic pancreas of man*. The Tohoku journal of experimental medicine, 125(2), 185-197.
28. Wittingen, J., & Frey, C. F. (1974). *Islet concentration in the head, body, tail and uncinat process of the pancreas*. Annals of surgery, 179(4), 412.
29. Butler, A. E., Janson, J., Bonner-Weir, S., Ritzel, R., Rizza, R. A., & Butler, P. C. (2003). *β -cell deficit and increased β -cell apoptosis in humans with type 2 diabetes*. Diabetes, 52(1), 102-110.
30. Weir, G. C., & Bonner-Weir, S. (2013). *Islet β cell mass in diabetes and how it relates to function, birth, and death*. Annals of the New York Academy of Sciences, 1281(1), 92-105.
31. Babu, D. A., Deering, T. G., & Mirmira, R. G. (2007). *A feat of metabolic proportions: Pdx1 orchestrates islet development and function in the maintenance of glucose homeostasis*. Molecular genetics and metabolism, 92(1), 43-55.
32. Duckworth, W. C., Bennett, R. G., & Hamel, F. G. (1998). *Insulin Degradation: Progress and Potential 1*. Endocrine reviews, 19(5), 608-624.
33. Bondy, C. A., Zhou, J., Chin, E., Reinhardt, R. R., Ding, L., & Roth, R. A. (1994). *Cellular distribution of insulin-degrading enzyme gene expression. Comparison with insulin and insulin-like growth factor receptors*. Journal of Clinical Investigation, 93(3), 966.
34. Pivovarova, O., et al., *Glucose inhibits the insulin-induced activation of the insulin-degrading enzyme in HepG2 cells*. Diabetologia, 2009. 52(8): p. 1656-64.
35. López Acosta, J. F. (2013). *Búsqueda de dianas terapéuticas en la célula Beta-Pancreática para el tratamiento de la diabetes*.
36. Valera Mora, M. E., Scarfone, A., Calvani, M., Greco, A. V., & Mingrone, G. (2003). *Insulin clearance in obesity*. Journal of the American College of Nutrition, 22(6), 487-493

37. Neal, G. W., & Kitabchi, A. E. (1982). Insulin degradation by human skeletal muscle. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 719(2), 259-266
38. Shii, K., Yokono, K., Baba, S., & Roth, R. A. (1986). *Purification and characterization of insulin-degrading enzyme from human erythrocytes. Diabetes*, 35(6), 675-683.
39. Peitis, A. N., Mueller, R. A., Struve, M. F., Smith, G. A., & Kissebah, A. H. (1987). *Relationship of Androgenic Activity to Splanchnic Insulin Metabolism and Peripheral Glucose Utilization in Premenopausal Women. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 64(1), 162-169.